

08.10.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 5 0 1 6 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 5 0 1 6 7]

REC'D 26 NOV 2004

WIPO

PCT

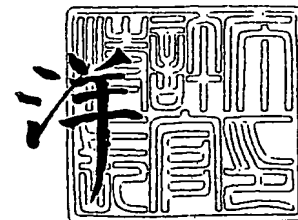
出 願 人 協和醗酵工業株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 1 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 1 9 2 9

【書類名】 特許願
【整理番号】 H15-1941Y2
【提出日】 平成15年10月 9日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
 研究所内
 【氏名】 今井 春江
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
 研究所内
 【氏名】 佐藤 光男
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
 研究所内
 【氏名】 森 勝弘
【特許出願人】
 【識別番号】 000001029
 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社
 【代表者】 松田 譲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 008187
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNA、配列番号9～30のいずれかで表される塩基配列中の連続した10～40の塩基配列で表される塩基配列からなるDNAに対応するRNAおよび配列番号9～30のいずれかで表される塩基配列からなる群のRNAから選ばれるRNAであって、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNAから選ばれるRNAおよび該RNAの相補RNAで構成される2本鎖RNAを細胞内に導入または発現させた細胞を用いることを特徴とする、抗体組成物の製造方法。

【請求項 2】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が、 α 1,6-フコース転移酵素である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

α 1,6-フコース転移酵素が、以下の(a)～(h)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項2に記載の方法。

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA;
- (b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA;
- (c) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA;
- (d) 配列番号4で表される塩基配列からなるDNA;
- (e) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA;
- (f) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA;
- (g) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA;
- (h) 配列番号4で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項 4】

α 1,6-フコース転移酵素が、以下の(a)～(i)からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項2に記載の方法。

- (a) 配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;
- (b) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;
- (c) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;
- (d) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;
- (e) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質;
- (f) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質;
- (g) 配列番号7で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質;
- (h) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質;
- (i) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列から

なり、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質；

(j) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質；

(k) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質；

(l) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコース転移酵素活性を有する蛋白質。

【請求項 5】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞が、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞である、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

以下の (a)～(d) からなる群から選ばれるレクチンのいずれか 1 つに耐性である、請求項 5 に記載の方法。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒイロチャワンタケレクチン。

【請求項 7】

細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

細胞が、下記の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞である、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；

(c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞。

【請求項 9】

細胞が、抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体である、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

抗体分子が、以下の (a)～(d) からなる群から選ばれる分子である、請求項 9 に記載の方法。

(a) ヒト抗体；

(b) ヒト化抗体；

(c) (a) または (b) のFc領域を含む抗体断片；

(d) (a) または (b) のFc領域を有する融合蛋白質。

【請求項 11】

抗体分子のクラスがIgGである、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の機能を抑制するRNA、配列番号 9～30 のいずれ

かで表される塩基配列中の連続した10~40の塩基配列で表される塩基配列からなるDNAに対応するRNAおよび配列番号9~30のいずれかで表される塩基配列からなる群のRNAから選ばれるRNAであって、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNAから選ばれるRNAを導入していない親株細胞が生産する抗体組成物の抗体依存性細胞傷害活性より、高い抗体依存性細胞傷害活性を有する抗体組成物を製造する、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

高い抗体依存性細胞傷害活性を有する抗体組成物が、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞が生産する抗体組成物よりも高いことを特徴とする、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

高い抗体依存性細胞傷害活性を有する抗体組成物が、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物である、請求項12~14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

抗体依存性細胞傷害活性が高い抗体組成物が、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物である、請求項12~15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

請求項1~16のいずれか1項に記載の方法で用いられる、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞。

【請求項18】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコース転移酵素である請求項17に記載の細胞。

【請求項19】

配列番号9~30のいずれかで表される塩基配列からなる群のRNAから選ばれるRNAを導入または発現させた細胞。

【請求項20】

配列番号9~30のいずれかで表される塩基配列からなる群から選ばれるRNAおよび該RNAの相補RNAで構成される2本鎖RNA。

【請求項21】

配列番号9~30のいずれかで表される塩基配列からなる群のRNAから選ばれるRNAであって、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNAから選ばれるRNA及び該RNAの相補RNAで構成される2本鎖RNA。

【請求項22】

請求項20または21に記載のRNAに対応するDNAおよび該DNAの相補DNA。

【請求項23】

請求項 20 または 21 に記載の RNA に対応する DNA および該 DNA の相補 DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。

【請求項 24】

請求項 20 または 21 に記載の 2 本鎖 RNA を発現させることを特徴とする、請求項 23 に記載の組換え体 DNA。

【請求項 25】

請求項 23 または 24 に記載の組換え体 DNA を細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 26】

請求項 20 または 21 に記載の 2 本鎖 RNA を細胞内に導入または発現させることを特徴とする、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を作製する方法。

【請求項 27】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性が、少なくとも、以下の (a) ~ (d) からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、請求項 26 に記載の方法。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒイロチャワンタケレクチン。

【請求項 28】

配列番号 9 ~ 30 のいずれかで表される塩基配列からなる群の RNA から選ばれる RNA を用いて、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する方法。

【請求項 29】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコース転移酵素である請求項 28 に記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼの機能を抑制するRNAを用いた抗体組成物の製造法

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞を用いて抗体組成物を製造する方法において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞を用いることを特徴とする、抗体組成物を製造する方法、該製造方法で用いられる該RNA、該RNAに対応するDNAおよび該RNAまたはDNAを導入したまたは発現させた細胞、該細胞の作製方法および該酵素を抑制する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一般的に、医薬への応用が考えられているヒト化抗体の多くは、遺伝子組換え技術を用いて作製され、動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞などを宿主細胞として用い製造されているが、抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC活性と表記する）、補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC活性と表記する）等の抗体のエフェクター機能には糖鎖構造、特に抗体のN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加が重要な役割を担っていること（特許文献1）、宿主細胞によって発現された糖蛋白質の糖鎖構造に違いが観察されることから（非特許文献1）、より高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能な生産細胞の開発が望まれている。

【0003】

細胞の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を調節し、生産される糖蛋白質の糖鎖構造を改変する方法として、糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤を応用することが試みられている。しかしながら、阻害剤の特異性は弱く、また標的とする酵素を十分に阻害することも難しいため、生産抗体の糖鎖構造を確実に制御することは難しい。

また、糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子を導入することによって、生産される糖蛋白質の糖鎖構造を改変することも試みられている（非特許文献2、非特許文献3）。 β 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素III（GnTIII）を導入したCHO細胞を用いて抗体を発現させた場合には、親株で発現させた抗体と比べて16倍高いADCC活性を示した（非特許文献4、特許文献2）。しかしながら、GnTIIIあるいは β 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素V（GnTV）の過剰発現はCHO細胞に対して毒性を示すため、抗体医薬の生産には適切ではない。

【0004】

糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子の活性が変化した突然変異体を宿主細胞として用いることで、生産される糖鎖構造が変化した糖蛋白質の生産例も報告されている。（非特許文献5）、最近になって、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの生合成に関与する酵素であるGDP-mannose 4,6-dehydratase（以下、GMDと表記する）の発現が低下した細胞株、例えばCHO細胞Lec13株などを用いて、ADCC活性が有為に上昇した抗体の発現に成功した例が報告された（非特許文献6）。

【0005】

変異剤処理によって取得された株の変異は、ランダムに導入されており、目的としない変異の導入が想定されるため、医薬品製造に用いる株として適切ではない。

以上のように、生産される糖蛋白質の糖鎖構造を改変するために、宿主細胞の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を調節する試みがなされているが、実際には糖鎖の修飾機構は多様かつ複雑であり、かつ糖鎖が持つ生理的な役割の解明も十分とはいえないため試行錯誤を繰り返しているのが現状である。

【0006】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、哺乳動物では、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）が存在することが知られている（非特許文献7）。 α 1,6-フコシル

トランスフェラーゼ (EC 2.4.1.68) の遺伝子構造は1996年に明らかにされた (特許文献3、非特許文献8、非特許文献9)。

【0007】

このような中、免疫グロブリンIgG1の糖鎖構造へのフコースの修飾により、抗体自身の抗体依存性細胞傷害活性が変化することが報告され、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼの活性との関係が注目されている (特許文献1、特許文献4、非特許文献1、非特許文献10)。具体的には、1) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼを過剰に発現させた細胞株が生産する抗体の抗体依存性細胞傷害活性は低下すること、2) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼの対立遺伝子の片方を破壊した細胞株が生産する抗体の抗体依存性細胞傷害活性は上昇することが示されている (特許文献1)。したがって、より簡便にかつ効率的に、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を制御することが可能な方法が開発されれば、医薬品としてより有用なエフェクター作用の高い抗体組成物の提供が可能となる。しかしながら、上述の相同組換え法による遺伝子破壊の方法以外に、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を人為的に抑制する方法は報告されていない。

【特許文献1】W002/31140

【特許文献2】W099/54342

【特許文献3】W092/27303

【特許文献4】W000/61739

【非特許文献1】J. Biol. Chem., 278, 3466 (2003)

【非特許文献2】J. Biol. Chem., 261, 13848 (1989)

【非特許文献3】Science, 252, 1668 (1991)

【非特許文献4】Glycobiology, 5, 813 (1995)

【非特許文献5】J. Immunol., 160, 3393 (1998)

【非特許文献6】J. Biol. Chem., 277, 26733 (2002)

【非特許文献7】Biochem. Biophys. Res. Commun., 72, 909 (1976)

【非特許文献8】J. Biol. Chem., 271, 27817 (1996)

【非特許文献9】J. Biochem., 121, 626 (1997)

【非特許文献10】J. Biol. Chem., 277, 26733 (2002)

【非特許文献11】Science, 252, 1668 (1991)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、以下の(1)～(29)に関する。

(1) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNA、配列番号9～30のいずれかで表される塩基配列中の連続した10～40の塩基配列で表される塩基配列からなるDNAに対応するRNAおよび配列番号9～30のいずれかで表される塩基配列からなる群のRNAから選ばれるRNAであって、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNAから選ばれるRNAおよび該RNAの相補RNAで構成される2本鎖RNAを細胞内に導入または発現させた細胞を用いることを特徴とする、抗体組成物の製造方法。

(2) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(1)に記載の方法。

(3) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)～(h)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、(2)に記載の方法。

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；

- (b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA;
- (c) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA;
- (d) 配列番号4で表される塩基配列からなるDNA;
- (e) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA;
- (f) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA;
- (g) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA;
- (h) 配列番号4で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(4) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)~(l)からなる群から選ばれる蛋白質である、(2)に記載の方法。

- (a) 配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;
- (b) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;
- (c) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;
- (d) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;
- (e) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;
- (f) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;
- (g) 配列番号7で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;
- (h) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;
- (i) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;
- (j) 配列番号6で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;
- (k) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;
- (l) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(5) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞が、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞である、(1)~(4)のいずれか1項に記載の方法。

(6) 以下の(a)~(d)からなる群から選ばれるレクチンのいずれか1つに耐性である、(5)に記載の方法。

- (a) レンズマメレクチン;
- (b) エンドウマメレクチン;
- (c) ソラマメレクチン;
- (d) ヒイロチャワンタケレクチン。

(7) 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、(1)~(6)のいずれか1項に記載の方法。

(8) 細胞が、下記の (a)~(i) からなる群から選ばれる細胞である、(1)~(7) のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

(9) 細胞が、抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体である、(1)~(8) のいずれか 1 項に記載の方法。

(10) 抗体分子が、以下の (a)~(d) からなる群から選ばれる分子である、(9) に記載の方法。

- (a) ヒト抗体；
- (b) ヒト化抗体；
- (c) (a) または (b) のFc領域を含む抗体断片；
- (d) (a) または (b) のFc領域を有する融合蛋白質。

(11) 抗体分子のクラスがIgGである、(9) または (10) に記載の方法。

(12) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNA、配列番号9~30のいずれかで表される塩基配列中の連続した10~40の塩基配列で表される塩基配列からなるDNAに対応するRNAおよび配列番号9~30のいずれかで表される塩基配列からなる群のRNAから選ばれるRNAであって、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNAから選ばれるRNAを導入していない親株細胞が生産する抗体組成物の抗体依存性細胞傷害活性より、高い抗体依存性細胞傷害活性を有する抗体組成物を製造する、(1)~(11) のいずれか 1 項に記載の方法。

(13) 高い抗体依存性細胞傷害活性を有する抗体組成物が、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、親株細胞が生産する抗体組成物よりも高いことを特徴とする、(12) に記載の方法。

(14) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、(13) に記載の方法。

(15) 高い抗体依存性細胞傷害活性を有する抗体組成物が、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物である、(12)~(14) のいずれか 1 項に記載の方法。

(16) 抗体依存性細胞傷害活性が高い抗体組成物が、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる抗体組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物である、(12)~(15) のいずれか 1 項に記載の方法。

(17) (1)~(16) のいずれか 1 項に記載の方法で用いられる、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞。

(18) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである(17)に記載の細胞。

(19) 配列番号9~30のいずれかで表される塩基配列からなる群のRNAから選ばれるRNAを導入または発現させた細胞。

(20) 配列番号9~30のいずれかで表される塩基配列からなる群から選ばれるRNAおよび該RNAの相補RNAで構成される2本鎖RNA。

(21) 配列番号9~30のいずれかで表される塩基配列からなる群のRNAから選ばれるRNAであって、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNAから選ばれるRNA及び該RNAの相補RNAで構成される2本鎖RNA。

(22) (20) または (21) に記載のRNAに対応するDNAおよび該DNAの相補DNA。

(23) (20) または (21) に記載のRNAに対応するDNAおよび該DNAの相補DNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(24) (20) または (21) に記載の2本鎖RNAを発現させることを特徴とする、

(23) に記載の組換え体DNA。

(25) (23) または (24) に記載の組換え体DNAを細胞に導入して得られる形質転換体。

(26) (20) または (21) に記載の2本鎖RNAを細胞内に導入または発現させることを特徴とする、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を作製する方法。

(27) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性が、少なくとも、以下の(a)~(d)からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、(26)に記載の方法。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒイロチャワンタケレクチン。

(28) 配列番号9~30のいずれかで表される塩基配列からなる群のRNAから選ばれるRNAを用いて、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する方法。

(29) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである(28)に記載の方法。

【発明の効果】

【0009】

細胞を用いて抗体組成物を製造する方法において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞を用いることを特徴とする、抗体組成物を製造する方法、該製造方法で用いられる該RNA、該RNAに対応するDNAおよび該RNAまたはDNAを導入したまたは発現させた細胞、該細胞の作製方法および該酵素を抑制する方法を提供することである。本発明の方法により製造される抗体組成物は高いエフェクター活性を有しており、医薬品として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明は、細胞を用いて抗体組成物を製造する方法において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞を用いることを特徴とする、抗体組成

物を製造する方法、該製造方法で用いられる該RNA、該RNAに対応するDNAおよび該RNAまたはDNAを導入したまたは発現させた細胞、該細胞の作製方法および該酵素を抑制する方法に関する。

【0011】

細胞を用いて抗体組成物を製造する方法としては、ハイブリドーマ細胞を用いてモノクローナル抗体を製造する方法、抗体遺伝子を導入した宿主細胞を用いてヒト抗体およびヒト化抗体を製造する方法、抗体遺伝子を導入したヒト以外の動物の胚性幹細胞または受精卵細胞をヒト以外の動物の初期胚へ移植後、発生させたトランスジェニック非ヒト動物を用いてヒト抗体およびヒト化抗体を製造する方法、抗体遺伝子を導入した植物カルス細胞より作製したトランスジェニック植物を用いてヒト抗体およびヒト化抗体を製造する方法などを包含する。

【0012】

本発明の方法で用いられる細胞としては、抗体分子を発現できる細胞であればいかなる細胞でもよいが、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられ、本発明の細胞としては、好ましくは動物細胞があげられる。本発明の動物細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞、ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞、マウスミエローマ細胞株NSO細胞、マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などがあげられる。

【0013】

本発明の、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する。該RNAを導入していない親株細胞は、該レクチンに耐性を有さない。

【0014】

したがって、本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など抗体組成物を製造することができる細胞であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞があげられ、具体的には、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する、ハイブリドーマ細胞、ヒト抗体およびヒト化抗体を製造するための宿主細胞、ヒト抗体を生産するためのトランスジェニック非ヒト動物を製造する胚性幹細胞および受精卵細胞、ヒト抗体を生産するためのトランスジェニック植物を製造する植物カルス細胞、ミエローマ細胞、トランスジェニック非ヒト動物由来の細胞などがあげられる。また、本発明のトランスジェニック非ヒト動物由来のミエローマ細胞はハイブリドーマ細胞を製造する際に融合細胞として用いることができる。さらに、上記のトランスジェニック非ヒト動物に抗原を免疫し該動物の脾臓細胞を用いて公知の方法でハイブリドーマ細胞を作製することもできる。

【0015】

レクチンに耐性を有する細胞とは、培養培地にレクチンを有効濃度与えて細胞培養を行ったときにも、生育が阻害されない細胞をいう。

本発明において、生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、親株細胞に用いる細胞株に応じて適宜定めればよいが、通常 $10\mu\text{g/mL}$ ~ 10.0mg/mL 、好ましくは 0.5 ~ 2.0mg/mL である。親株細胞にN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した場合のレクチンの有効濃度とは、該親株細胞が正常に生育できない濃度以上の濃度であり、好ましくは該親株細胞が正常に生育できない濃度と同濃度、より好ましくは2~5倍の濃度

、さらに好ましくは10倍の濃度、最も好ましくは20倍以上の濃度をいう。

【0016】

親株細胞とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入する前の細胞をいう。以下に親株細胞の具体例を示す。

NSO細胞の親株細胞としては、バイオ/テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)、バイオテクノロジー・バイオエンジニアリング(Biotechnol. Bioeng.), 73, 261, (2001)等の文献に記載されているNSO細胞があげられる。また、理化学研究所細胞開発銀行に登録されているNSO細胞株(RCB0213)、あるいはこれら株を生育可能な様々な培地に馴化させた亜株などもあげられる。

【0017】

SP2/0-Ag14細胞の親株細胞としては、ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 126, 317, (1981)、ネイチャー(Nature), 276, 269, (1978)、ヒューマン・アンチボディーズ・アンド・ハイブリドーマズ(Human Antibodies and Hybridomas, 3, 129, (1992)等の文献に記載されているSP2/0-Ag14細胞があげられる。また、アメリカンタイプカルチャーコレクション(以下、ATCCとも表記する)に登録されているSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL-1581)あるいはこれら株を生育可能な様々な培地に馴化させた亜株(ATCC CRL-1581.1)などもあげられる。

【0018】

チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞の親株細胞としては、Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968)、Genetics, 55, 513 (1968)、Chromosoma, 41, 129 (1973)、Methods in Cell Science, 18, 115 (1996)、Radiation Research, 148, 260 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)、Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1275 (1968)、Cell, 6, 121 (1975)、Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (p883-900)等の文献に記載されているCHO細胞などがあげられる。また、ATCCに登録されているCHO-K1株(ATCC CCL-61)、DUXB11株(ATCC CRL-9096)、Pro-5株(ATCC CRL-1781)や、市販のCHO-S株(Lifetechnologies社 Cat1619)、あるいはこれら株を生育可能な様々な培地に馴化させた亜株などもあげられる。

【0019】

ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞の親株細胞としては、Y3/Ag1.2.3細胞(ATCC CRL-1631)から樹立された株化細胞が包含される。その具体的な例としては、J. Cell. Biol. 93, 576 (1982)、Methods Enzymol. 73B, 1 (1981)等の文献に記載されているYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞があげられる。また、ATCCに登録されているYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL-1662)あるいはこれら株を生育可能な様々な培地に馴化させた亜株などもあげられる。

【0020】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、具体的には、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin)、エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin)などがあげられる。

【0021】

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する反応に影響を与える蛋白質であればいかなる蛋白質も包含される。

【0022】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1

位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼなどがあげられる。

また、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する反応に影響を与える蛋白質としては、上述のN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性または酵素の発現に影響を与える蛋白質も包含される。

【0023】

本発明において、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)~(h)のDNAがコードする蛋白質、または下記(i)~(t)の蛋白質などがあげられる。

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA；
- (c) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA；
- (d) 配列番号4で表される塩基配列からなるDNA；
- (e) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；
- (f) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；
- (g) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；
- (h) 配列番号4で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

または、

- (i) 配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (j) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (k) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (l) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (m) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (n) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (o) 配列番号7で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (p) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (q) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (r) 配列番号6で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (s) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (t) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

【0024】

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば、配列番号1、2、3または4で表される塩基配列を有するDNAなどのDNAまたはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼー

ション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1、2、3または4で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0025】

本発明において、配列番号5、6、7または8で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質とは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids RESEARCH, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号5、6、7または8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより取得することができる蛋白質を意味する。

【0026】

欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は1以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1~数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

また、本発明において、配列番号5、6、7または8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質とは、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号5、6、7または8に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有し、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質である。

【0027】

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAの長さとしては、10~40、好ましくは10~35、より好ましくは15~29の連続した以下に示すRNAがあげられる。

(a) 配列番号1で表される塩基配列中、連続した5塩基以上のアデニンあるいはチミジンを含まない部分の中で、連続した10~40の塩基配列で表される塩基配列からなるDNAに対応するRNA;

(b) 配列番号2で表される塩基配列中、連続した5塩基以上のアデニンあるいはチミジンを含まない部分の中で、連続した10~40の塩基配列で表される塩基配列からなるDNAに対応するRNA;

(c) 配列番号3で表される塩基配列中、連続した5塩基以上のアデニンあるいはチミジンを含まない部分の中で、連続した10~40の塩基配列で表される塩基配列からなるDNAに対応

するRNA;

(d) 配列番号4で表される塩基配列中、連続した5塩基以上のアデニンあるいはチミジンを含まない部分の中で、連続した10~40の塩基配列で表される塩基配列からなるDNAに対応するRNA;

具体的には、

(e) 配列番号9で表される塩基配列からなるRNA;

(f) 配列番号9で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(g) 配列番号10で表される塩基配列からなるRNA;

(h) 配列番号10で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(i) 配列番号11で表される塩基配列からなるRNA;

(j) 配列番号11で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(k) 配列番号12で表される塩基配列からなるRNA;

(l) 配列番号12で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(m) 配列番号13で表される塩基配列からなるRNA;

(n) 配列番号13で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(o) 配列番号14で表される塩基配列からなるRNA;

(p) 配列番号14で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(q) 配列番号15で表される塩基配列からなるRNA;

(r) 配列番号15で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(s) 配列番号16で表される塩基配列からなるRNA;

(t) 配列番号16で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(u) 配列番号17で表される塩基配列からなるRNA;

(v) 配列番号17で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

- (w) 配列番号18で表される塩基配列からなるRNA;
- (x) 配列番号18で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;
- (y) 配列番号19で表される塩基配列からなるRNA;
- (z) 配列番号19で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;
- (A) 配列番号20で表される塩基配列からなるRNA;
- (B) 配列番号20で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;
- (C) 配列番号21で表される塩基配列からなるRNA;
- (D) 配列番号21で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;
- (E) 配列番号22で表される塩基配列からなるRNA;
- (F) 配列番号22で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;
- (G) 配列番号23で表される塩基配列からなるRNA;
- (H) 配列番号23で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;
- (I) 配列番号24で表される塩基配列からなるRNA;
- (J) 配列番号24で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;
- (K) 配列番号25で表される塩基配列からなるRNA;
- (L) 配列番号25で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;
- (M) 配列番号26で表される塩基配列からなるRNA;
- (N) 配列番号26で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;
- (O) 配列番号27で表される塩基配列からなるRNA;
- (P) 配列番号27で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(Q) 配列番号28で表される塩基配列からなるRNA;

(R) 配列番号28で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(S) 配列番号29で表される塩基配列からなるRNA;

(T) 配列番号29で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

(U) 配列番号30で表される塩基配列からなるRNA;

(V) 配列番号30で表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列からなり、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制する活性を有するRNA;

があげられる。

【0028】

配列番号9~30でそれぞれ表される塩基配列において、1または数個の塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された塩基配列としては、塩基が欠失、置換、挿入および/または付加された結果生じる2本鎖RNAは、一方の鎖にのみ塩基が欠失、置換、挿入および/または付加されていてもよく、即ち、該2本鎖RNAは必ずしも完全な相補鎖でなくてもよい。

【0029】

本発明において、抗体組成物とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子を含有する組成物をいう。

抗体は、重鎖および軽鎖（以下、それぞれ「H鎖」および「L鎖」と表記する）の2種類のポリペプチド鎖がそれぞれ2分子ずつ会合した4量体である。H鎖のN末端側の約4分の1とL鎖のN末端側の約2分の1（それぞれ100余アミノ酸）は可変領域（以下、「V領域」と表記する）と呼ばれ、多様性に富み、抗原との結合に直接関与する。V領域以外の部分の大半は定常領域（以下、「C領域」と表記する）と呼ばれる。抗体分子はC領域の相同性によりIgG、IgM、IgA、IgD、IgEの各クラスに分類される。

【0030】

またIgGクラスはC領域の相同性により、さらにIgG1~IgG4のサブクラスに分類される。

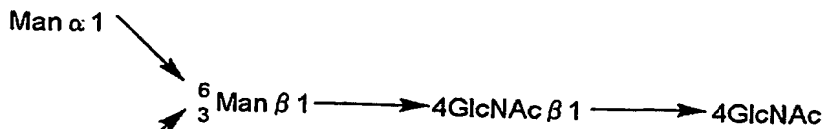
H鎖はN末端側よりVH、CH1、CH2、CH3の4つのイムノグロブリンドメインに分かれ、CH1とCH2の間にはヒンジ領域と呼ばれる可動性の高いペプチド領域があり、CH1とCH2とが区切られる。ヒンジ領域以降のCH2とCH3からなる構造単位はFc領域と呼ばれ、N-グリコシド結合型糖鎖が結合している。また、この領域は、Fcレセプター、補体などが結合する領域である（免疫学イラストレイテッド原書第5版、2000年2月10日発行、南江堂版、抗体工学入門、1994年1月25日初版、地人書館）。

【0031】

抗体などの糖蛋白質の糖鎖は、蛋白質部分との結合様式により、アスパラギンと結合する糖鎖（N-グリコシド結合糖鎖）とセリン、スレオニンなどと結合する糖鎖（O-グリコシル結合糖鎖）の2種類に大別される。N-グリコシド結合糖鎖は、以下の化学式1に示す基本となる共通のコア構造を有する〔生物化学実験法23-糖蛋白質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989年）〕。

【0032】

【化1】



構造式 (I)

【0033】

化学式1において、アスパラギンと結合する糖鎖の末端を還元末端、反対側を非還元末端という。

N-グリコシド結合糖鎖としては、化学式1で示されるのコア構造を有するものがあげられ、コア構造の非還元末端にマンノースのみが結合するハイマンノース型、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAcと表記する）の枝を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのN-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型（複合型）、コア構造の非還元末端側にハイマンノース型とコンプレックス型の両方の枝を持つハイブリッド型などがあげられる。

【0034】

抗体分子のFc領域には、N-グリコシド結合糖鎖が1カ所ずつ結合する領域を有しているので、抗体1分子あたり2本の糖鎖が結合している。抗体分子に結合するN-グリコシド結合糖鎖としては、化学式1で示されるコア構造を含むいかなる糖鎖も包含されるので、抗体に結合する2本のN-グリコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在する。

したがって、本発明において、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の機能を抑制するRNAを導入した細胞を用いて製造した抗体組成物は、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。

【0035】

抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合（以下、「本発明の糖鎖の割合」と表記する）とは、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全てのN-グリコシド結合複合型糖鎖の合計数に対して、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の数が占める割合をいう。

【0036】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、フコースが、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに α 結合していない糖鎖をいう。具体的には、フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖があげられる。本発明の糖鎖の割合が高いほど、抗体組成物のADCC活性が高くなる。

【0037】

ADCC活性が高い抗体組成物としては、本発明の糖鎖の割合が、好ましくは20%以上、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは40%以上、特に好ましくは50%以上、最も好ましくは100%である抗体組成物があげられる。

また、本発明は、親株細胞が生産する抗体組成物よりADCC活性が高い抗体組成物の製造方法に関する。

【0038】

本発明の糖鎖の割合が、親株細胞が生産する抗体組成物よりも高い場合、親株細胞が生産する抗体組成物より高いADCC活性を有する。

ADCC活性とは、生体内で、腫瘍細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体Fc領

域とエフェクター細胞表面上に存在するFcレセプターとの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を傷害する活性をいう[モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ(Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。エフェクター細胞としては、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等があげられる。

【0039】

N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子を含有する組成物中に含まれる、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法23—糖蛋白質糖鎖研究法(学会出版センター)高橋禮子編(1989)]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識または同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖をHPAED-PAD法[ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー(J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577 (1983)]によって分析することによっても決定することができる。

【0040】

抗体分子としては、抗体のFc領域を含む分子であればいかなる分子も包含される。具体的には、抗体、抗体断片、Fc領域を含む融合蛋白質などがあげられる。

抗体としては、動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体のほかにも、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。

【0041】

ハイブリドーマは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウス、ラット等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を生産する細胞をいう。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体H鎖V領域(以下、「HV」または「VH」とも称す)および抗体L鎖V領域(以下、「LV」または「VL」とも称す)とヒト抗体のH鎖C領域(以下、「CH」とも称す)およびヒト抗体のL鎖C領域(以下、「CL」とも称す)とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

【0042】

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン(以下、「hIg」と表記する)に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。

【0043】

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体をいう。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列に移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することによりヒト型CDR移植抗体を発現させ、製造することができる。

【0044】

ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーならびにヒト抗体トランスジェニック動物あるいはヒト抗体トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

【0045】

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を生産するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

【0046】

ヒト抗体トランスジェニック非ヒト動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物をいう。具体的には、マウス胚性幹細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該胚性幹細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体を産生するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。また、動物の受精卵にヒト抗体遺伝子を導入し、該受精卵を発生させることにヒト抗体を産生するトランスジェニック非ヒト動物を作製することもできる。ヒト抗体を産生するトランスジェニック非ヒト動物からのヒト抗体の作製方法は、通常ヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を蓄積させることができる。

【0047】

トランスジェニック非ヒト動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サルまたはウサギ等があげられる。

また、本発明において、抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体であることが好ましく、抗体のクラスはIgGが好ましい。

【0048】

抗体断片は、上記の抗体のFc領域を含んだ抗体断片があげられる。抗体断片としては、上記抗体のFc領域を含んだ断片があげられ、具体的には、H鎖の単量体、H鎖の2量体などがあげられる。

Fc領域を有する融合蛋白質としては、抗体のFc領域と、抗体断片、酵素、サイトカインなどの蛋白質とを融合させた物質であればいかなるものでもよい。

以下、本発明の製造方法を詳細に説明する。

1. 本発明の製造に用いる細胞の作製

本発明の、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞（以下、「本発明の細胞」と略記する）は、例えば、以下のように作製することができる。

【0049】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1

位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAあるいはゲノムDNAを調製する。

調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さのRNA i 遺伝子のコンストラクトを設計する。

【0050】

該RNA i 遺伝子を細胞内で発現させるために、調製したDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

導入したN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を得ることができる。

【0051】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とするN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の2. に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したRNA i 遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、ポリメラーゼIIIにより転写が行われるタイプの発現ベクターあるいは後述の2. に記載の発現ベクターがあげられる。

【0052】

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の2. に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNA及びゲノムDNAを取得する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

cDNAの調製方法

各種宿主細胞から全RNAまたはmRNAを調製する。

【0053】

調製した全RNAまたはmRNAからcDNAライブラリーを作製する。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の既知アミノ酸配列、例えばヒトのアミノ酸配列、に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法にて、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

【0054】

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNAライブラリーをスクリーニングし、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAを取得することができる。

各種宿主細胞のmRNAは、市販のもの(例えばClontech社製)を用いてもよいし、以下のごとく各種宿主細胞から調製してもよい。各種宿主細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン・トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Bi

ochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

【0055】

また、全RNAからpoly(A)⁺ RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第2版) 等があげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) などのキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

【0056】

調製した各種宿主細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社製)を用いる方法などがあげられる。

【0057】

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社製、ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acid Research), 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (STRATAGENE社製)、 λ gt10、 λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ(DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (Clontech社製)、 λ ExCell (Pharmacia社製)、pT7T318U (Pharmacia社製)、pCD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー(Molecular Cell Biol.), 3, 280 (1983)] およびpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

【0058】

cDNAライブラリーを作製するための宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Escherichia coli X L1-Blue MRF' [STRATAGENE社製、ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [ジェネティクス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] およびEscherichia coli JM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

【0059】

このcDNAライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げ、なるべく完全長cDNAを効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [ジーン(Gene), 138, 171 (1994); ジーン(Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNAクローニング(羊土社)(1996); 遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社)(1994)] を用いて調製したcDNAライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

【0060】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に参与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の5'端および3'端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法 [ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いてDNAの増幅を行うことにより、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に参与する酵素をコードする遺伝子断片を取得

することができる。

【0061】

取得した遺伝子断片がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM377 DNAシーケンサー (PE Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

【0062】

該遺伝子断片をDNAプローブとして、各種宿主細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第2版) を行うことにより、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することができる。

【0063】

また、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、各種宿主細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法を用いてスクリーニングを行うことにより、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することもできる。

【0064】

取得したN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAの塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM377 DNAシーケンサー (PE Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

【0065】

決定したcDNAの塩基配列をもとに、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中でN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子を決定することもできる。

【0066】

上記の方法で得られるN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号1、2、3または4に記載の塩基配列が挙げられる。

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のDNA合成機model 392等のDNA合成機で化学合成することにより、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを取得することもできる。

【0067】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法が挙げられる。

ゲノムDNAの調製方法

ゲノムDNAを調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems社製) やUniversal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH社製) などを用いることにより、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素のゲノムDNAを単離することもできる。

【0068】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法があげられる。

形質転換体を選択する方法

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の活性が低下した細胞を選択する方法としては、文献[新生化学実験講座3—糖質I, 糖蛋白質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)]、文献[細胞工学, 別冊, 実験プロトコールシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコール, 糖蛋白質・糖脂質・プロテオグリカン(秀潤社製)谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修(1996)]、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などがあげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を測定する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の遺伝子のmRNA量を測定するノーザン解析やRT-PCR法等があげられる。

【0069】

また、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素の活性が低下した結果生じる形質の変化を指標に細胞を選択する方法としては、例えば、産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法や、細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法などが挙げられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、後述の4.に記載の方法が挙げられる。細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を挙げることができる。その具体的な例としては、ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.), 12, 51, (1986)等に記載のレクチンを用いた方法が挙げられる。

【0070】

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、好ましくはレンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒヨロチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin) 等があげられる。

【0071】

具体的には、10 μ g/mL~10mg/mL、好ましくは0.5~2.0mg/mLの濃度の上述のレクチンを含む培地に1日~2週間、好ましくは3日~1週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーを採取後、別の培養器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることで、本発明の細胞を選択することができる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1

位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子のmRNA量を抑制するためのRNA i 遺伝子は、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

【0072】

RNA i 遺伝子のコンストラクトは、[ネイチャー(Nature), 391, 806, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 15502, (1998); ネイチャー(Nature), 395, 854, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049, (1999); セル(Cell), 95, 1017, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 1451, (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 13959, (1998); ネイチャー・セル・バイオロジー(Nature Cell Biol.), 2, 70, (2000); ネイチャー(Nature), 411, 494, (2001); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 98, 9742, (2001)]等の記載に従って設計することができる。

【0073】

また、発現ベクターを用いず、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計した2本鎖RNAを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の細胞を得ることができる。

2本鎖RNAは、常法またはRNA合成機を用いることにより調製することができる。具体的には、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAおよびゲノムDNAの相補RNA塩基配列のうち、連続した1~40塩基、好ましくは5~40塩基、より好ましくは10~35塩基、さらに好ましくは15~29塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド(アンチセンスオリゴヌクレオチド)を合成することで調製することができる。該オリゴヌクレオチドとアンチセンスオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に合成してもよいし、2本鎖RNA形成に支障のないようなスパーサーヌクレオチドでつながれていてもよい。

【0074】

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴRNAおよび該オリゴヌクレオチドの誘導体(以下、オリゴヌクレオチド誘導体という)等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる[細胞工学, 16, 1463 (1997)]。

2. 抗体組成物の製造方法

抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988(以下、アンチボディズと略す)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993(以下、モノクローナルアンチボディズと略す)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford

University Press, 1996 (以下、アンチボディエンジニアリングと略す) 等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

【0075】

抗体分子のcDNAを調製する。

調製した抗体分子の全長cDNAをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、または全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

【0076】

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体分子を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞として、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができるが、好ましくは動物細胞があげられる。

抗体分子のFc領域に結合するN-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素を遺伝子工学的な手法を用いて導入した、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等の細胞を宿主細胞として用いることもできる。

【0077】

本発明の抗体組成物の製造方法に用いられる宿主細胞としては、上記1. で作製した、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞をあげることができる。

発現ベクターとしては、上記各種宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込が可能で、目的とする抗体分子をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0078】

cDNAは、上記1. に記載の「cDNAの調製方法」に従い、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞より、目的とする抗体分子に特異的なプローブプライマーを用いて調製することができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等をあげることができる。

【0079】

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキサースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

【0080】

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する酵母、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [メソッズ・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriology), 153, 163 (1983)]、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 75, 1929 (1978)] に記載の方法等をあげることができる。

【0081】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pCDNAI、pCDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)]、pAS3-3 [特開平2-227075]、pCDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840, (1987)]、pCDNAI/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochemistry), 101, 1307 (1987)]、pAGE210等をあげることができる。

【0082】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0083】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [特開平2-227075]、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (以下、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版と略す)]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [特許第2606856、特許第2517813]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編(1994)]、ウイルスベクター法 [マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版]等をあげることができる。

【0084】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー-Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

【0085】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社製)等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグセラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

【0086】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー-Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、TriCHOplusianiの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オ

ブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

【0087】

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

【0088】

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) [特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本特許第2606856、日本特許第2517813]等をあげることができる。

【0089】

抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した、酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞等により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

【0090】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0091】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

【0092】

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15~40℃がよく、培養時間は、通常16時間~7日間である。培養中のpHは3.0~9.0に保持する。pHの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0093】

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添

加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0094】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [サイエンス (Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [ヴュウロロジー (Virology), 8, 396 (1959)]、199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、Whitten培地 [発生工学実験マニュアル-トランスジェニック・マウスの作り方 (講談社) 勝木元也編 (1987)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0095】

培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。フェドバッチ培養、ホロファイバー培養などの培養法を用いて1日~数ヶ月培養を行うこともできる。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0096】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (Pharmingen社製)、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社製)、Ex Cell400、ExCell405 (いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium [ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常pH6~7、25~30℃等の条件下で、1~5日間行う。

【0097】

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ (MS) 培地、ホワイト (White) 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

【0098】

培養は、通常pH5~9、20~40℃の条件下で3~60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、抗体分子をコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する酵母、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

【0099】

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ

ブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント(Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平05-336963、W094/23021等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0100】

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードするDNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードするDNAを挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入した後に抗体分子を発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0101】

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体(トランスジェニック非ヒト動物)または植物個体(トランスジェニック植物)を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

【0102】

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法[アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S (1996); アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 9, 830 (1991)]に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産する方法があげられる。

【0103】

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク(特開昭63-309192)、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0104】

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法[組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); トレンド・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)]に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

【0105】

抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)ーセファロース、DIAION HPA-75(三菱化学(株)製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Pharmacia社)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを

用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

【0106】

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

【0107】

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

このようにして取得される抗体組成物として、例えば、抗体、抗体断片、抗体のFc領域を有する融合蛋白質などを挙げるることができる。

【0108】

以下に、抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体組成物およびFc融合蛋白質の製造方法について記すが、他の抗体組成物を上述の方法および当該方法に準じて取得することもできる。

A. ヒト化抗体組成物の製造

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

【0109】

ヒト抗体のC領域としては、任意のヒト抗体のCH及びCLであることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、「hC γ 1」と表記する）及びヒト抗体のL鎖の κ クラスのC領域（以下、「hC κ 」と表記する）等があげられる。

ヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。

【0110】

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル(Cell), 41, 479 (1985)]とエンハンサー [セル(Cell), 33, 717 (1983)]等があげられる。

【0111】

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容

易さ、動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。

【0112】

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

(2) ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のVH及びVLをコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

【0113】

目的のマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体のC領域部分或いはV領域部分をプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及びVLをコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体のVH及びVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVH及びVLの全アミノ酸配列を推定する。

【0114】

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

【0115】

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) やZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる方法などがあげられる。

【0116】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ ZAP II (Stratagene社製)、λ gt10、λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング: ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、λ ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pCD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及びpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

【0117】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (



1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及び JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

【0118】

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のVH及びVLをコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR法と表記する; モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] によりVH及びVLをコードするcDNAを調製することもできる。

【0119】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377シーケンサー (Applied Biosystems社製) 等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

【0120】

決定した塩基配列からVH及びVLの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVH及びVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

(3) ヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のVH及びVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VH及びVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVH及びVLのアミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することによって見出すことができる。

(4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項2のAの(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のVH及びVLをコードするcDNAをクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体のVH及びVLをコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体VH及びVLの3'末端側の塩基配列とヒト抗体のCH及びCLの5'末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結し、それぞれを本項2のAの(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することが

できる。

(5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVH及びVLをコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のVH及びVLのCDRを移植するヒト抗体のVH及びVLのフレームワーク（以下、FRと表記する）のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVH及びVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列〔シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991〕等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも60%以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

。

【0121】

次に、選択したヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のVH及びVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のVH及びVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度〔シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991〕を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のVH及びVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さから成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率及び合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

【0122】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2のAの(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、本項2のAの(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のVH及びVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

(6) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体のVH及びVLのCDRのみをヒト抗体のVH及びVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている〔バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)〕。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体のVH及びVLでは、CDRのみならず、FRのいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がCDRの移植に伴い、ヒト抗体のVH及びVLのFRの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型CDR移植抗体では、ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基やCDRのアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている〔バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)〕。

【0123】

ヒト型CDR移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 112,

535 (1977)〕或いはコンピューターモデリング〔プロテイン・エンジニアリング (Protein Engineering), 7, 1501 (1994)〕等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。

る。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型CDR移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型CDR移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

【0124】

ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸残基の改変は、改変用合成DNAを用いて本項2のAの(5)に記載のPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について本項2のAの(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

(7) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

本項2のAの(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子上流に、本項2のAの(5)及び(6)で構築したヒト型CDR移植抗体のVH及びVLをコードするcDNAをクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項2のAの(5)及び(6)でヒト型CDR移植抗体のVH及びVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2のAの(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

(8) ヒト化抗体の安定的生産

本項2のAの(4)及び(7)に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体(以下、併せてヒト化抗体と称す)を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

【0125】

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法[特開平2-257891; サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

【0126】

具体的には、マウスミエローマ細胞であるNS0細胞、SP2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr⁻細胞、CHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞、IR983F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるBHK細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞、前記1.に記載の細胞等があげられる。

【0127】

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418 sulfate(以下、G418と表記する; SIGMA社製)等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地(日水製薬社製)、GIT培地(日本製薬社製)、EX-CELL302培地(JRH社製)、IMDM培地(GIBCO BRL社製)、Hybridoma-SFM培地(GIBCO BRL社製)、またはこれら培地に牛胎児血清(以下、FBSと表記する)等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法[以下、ELISA法と表記する; アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

【0128】

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる [アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS-PAGEと表記する; ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 [アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] 等で測定することができる。

B. Fc融合蛋白質の製造

(1) Fc融合蛋白質発現用ベクターの構築

Fc融合蛋白質発現用ベクターとは、ヒト抗体のFc領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のFc領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子をクローニングすることにより構築することができる。

【0129】

ヒト抗体のFc領域としては、CH2とCH3領域を含む領域のほか、ヒンジ領域、CH1の一部が含まれるものも包含される。またCH2またはCH3の少なくとも1つのアミノ酸が欠失、置換、付加または挿入され、実質的にFc γ 受容体への結合活性を有するものであればいかなるものでもよい。

ヒト抗体のFc領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。それら遺伝子とFc領域を連結する方法としては、各遺伝子配列を鋳型として、PCR法(レキュラー・クローニング第2版; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34)を行うことがあげられる。

【0130】

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル (Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル (Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

(2) ヒト抗体のFc領域と融合させる蛋白質とをコードするDNAの取得

ヒト抗体のFc領域と融合させる蛋白質とをコードするDNAは以下のようにして取得することができる。

【0131】

目的のFcと融合させる蛋白質を発現している細胞や組織よりmRNAを抽出し、cDNAを合成

する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、目的の蛋白質の遺伝子配列部分をプローブとして用い、目的の蛋白質をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドを単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的の蛋白質の全塩基配列を決定し、塩基配列より全アミノ酸配列を推定する。

【0132】

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、細胞や組織を摘出することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

細胞や組織から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソツズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第2版) 等があげられる。また、細胞や組織からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

【0133】

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 (モレキュラー・クローニング第2版; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34)、或いは市販のキット、例えば、Super ScriptTM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) やZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる方法などがあげられる。

【0134】

cDNAライブラリーの作製の際、細胞や組織から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ ZAPII (Stratagene社製)、λ gt10、λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング: ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、λ ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pCD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及びpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

【0135】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)]及びJM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)]等が用いられる。

【0136】

cDNAライブラリーからの目的の蛋白質をコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第2版) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法により目的の蛋白質をコードするcDNAを調製することもできる。

【0137】

目的の蛋白質をヒト抗体のFc領域と融合させる方法としては、PCR法があげられる。例えば、目的の蛋白質の遺伝子配列の5'側と3'側に任意の合成オリゴDNA(プライマー)を設定し、PCR法を行いPCR産物を取得する。同様に、融合させるヒト抗体のFc領域の遺伝子配

列に対しても任意のプライマーを設定し、PCR産物を得る。このとき、融合させる蛋白質のPCR産物の3'側とFc領域のPCR産物の5'側には同じ制限酵素部位もしくは同じ遺伝子配列が存在するようにプライマーを設定する。この連結部分周辺のアミノ酸改変が必要である場合には、その変異を導入したプライマーを用いることで変異を導入する。得られた2種類のPCR断片を用いてさらにPCRを行うことで、両遺伝子を連結する。もしくは、同一の制限酵素処理をした後にライゲーションすることでも連結することができる。

【0138】

上記方法により連結された遺伝子配列を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM 377DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。

【0139】

決定した塩基配列からFc融合蛋白質の全アミノ酸配列を推定し、目的のアミノ酸配列と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含むFc融合蛋白質の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

(3) Fc融合蛋白質の安定的生産

本項2のBの(1)項に記載のFc融合蛋白質発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりFc融合蛋白質を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

【0140】

動物細胞へのFc融合蛋白質発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平2-257891; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] 等があげられる。

Fc融合蛋白質発現ベクターを導入する動物細胞としては、Fc融合蛋白質を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

【0141】

具体的には、マウスミエローマ細胞であるNS0細胞、SP2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr^r細胞、CHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞、IR983F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるBHK細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞、前記1.項に記載の本発明の方法に用いられる宿主細胞等があげられる。

【0142】

Fc融合蛋白質発現ベクターの導入後、Fc融合蛋白質を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地 (日水製薬社製)、GIT培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302培地 (JRH社製)、IMDM培地 (GIBCO BRL社製)、Hybridoma-SFM培地 (GIBCO BRL社製)、またはこれら培地にインスリン、インスリン様増殖因子、トランスフェリン、アルブミン等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にFc融合蛋白質を生産蓄積させることができる。培養上清中のFc融合蛋白質の生産量及び抗原結合活性はELISA法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、dhfr遺伝子増幅系等を利用してFc融合蛋白質の生産量を上昇させることができる。

【0143】

Fc融合蛋白質は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムやプロテインGカラムを用いて精製することができる (アンチボディズ, Chapter 8、モノクローナル・アンチボディズ)。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせ

で行い、精製することができる。精製したFc融合蛋白質分子全体の分子量は、SDS-PAGE [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 (アンチボディズ, Chapter 12、モノクローナル・アンティボディズ) 等で測定することができる。

【0144】

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物およびFc融合蛋白質の製造方法を示したが、上述のように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても製造することができる。

既に、宿主細胞が抗体分子を発現する能力を有している場合には、前記1. に記載の方法を用いて抗体分子を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、本発明の抗体組成物を製造することができる。

3. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合性あるいはエフェクター機能を測定する方法としては、モノクローナルアンチボディズ、あるいはアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定することにより、評価することができる [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

【0145】

また、抗体組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

4. 抗体組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖構造は、通常、糖蛋白質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

(1) 中性糖・アミノ糖組成分析

抗体分子の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

【0146】

具体的な方法として、Dionex社製糖組成分析装置 (BioLC) を用いる方法が挙げられる。BioLCはHPAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法 [ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agruc. Biol. Chem.), 55(1), 283-284 (1991)] に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC分析して組成比を算出することができる。

(2) 糖鎖構造解析

抗体分子の糖鎖の構造解析は、2次元糖鎖マップ法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)、生物化学実験法23-糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989年)] により行うことができる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィー糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

【0147】

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン（以下、PAと略記する）による糖鎖の蛍光標識〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J.Biochem.）, 95, 197（1984）〕を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード（TaKaRa社製）、文献〔アナリティカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem.）, 171, 73（1988）〕とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

【0148】

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

5. 本発明により得られる抗体組成物の利用

本発明により得られる抗体組成物は高いADCC活性を有する。高いADCC活性を有する抗体は、癌、炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、またはウイルスあるいは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

【0149】

癌、すなわち悪性腫瘍では癌細胞が増殖している。通常、抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高いADCC活性を有する抗体は、殺細胞効果により癌細胞を傷害することにより癌を治療することができるため、通常、抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分な場合が多く化学療法との併用療法が行われているが〔サイエンス(Science), 280, 1197, 1998〕、本発明の抗体組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもつながる。

【0150】

炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患において、それら疾患における生体内反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高いADCC活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応を抑えることができる。

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高いADCC活性を有する抗体を用いて抑えることより、循環器疾患を予防および治療することができる。

【0151】

ウイルスまたは細菌に感染した細胞の増殖を、高いADCC活性を有する抗体を用いて抑えることにより、ウイルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患を予防および治療することができる。

腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体の具体例を以下に述べる。

【0152】

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗CA125抗体（Immunology Today, 21, 403-410, 2000）、抗17-1A抗体（Immunology Today, 21, 403-410, 2000）、抗インテグリン $\alpha v \beta 3$ 抗体（Immunology Today, 21, 403-410, 2000）、抗CD33抗体（Immunology Today, 21, 403-410, 2000）、抗CD22抗体（Immunology Today, 21, 403-410, 2000）、抗HLA抗体（Immunology Today, 21, 403-410, 2000）、抗HLA-DR抗体（Immunology Today, 21, 403-410, 2000）、抗CD20抗体（Immunology Today, 21, 403-410, 2000）、抗CD19抗体（Immunology Today, 21, 403-410, 2000）、抗EGF受容体抗体（Immunology Today, 21, 403-410, 2000）、抗CD10抗体（American Journal of Clinical Pathology, 113, 374-382, 2000; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:4386-4391, 1982）、抗GD2抗体（Anticancer Res., 13, 331-336, 1993）、抗GD3抗体（Cancer Immunol. Immunother., 36, 260-266, 1993）

)、抗GM2抗体 (Cancer Res., 54, 1511-1516, 1994)、抗HER2抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗CD52抗体 (Nature, 332, 323-327, 1988)、抗MA CE抗体 (British J. Cancer, 83, 493-497, 2000)、抗HM1.24抗体 (Molecular Immunol., 36, 387-395, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Cancer, 88, 2909-2911, 2000)、抗FGF8抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911-9915, 1989) 抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗FGF8受容体抗体 (J. Biol. Chem., 265, 16455-16463, 1990)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗PMSA抗体 (J. Urology, 160, 2396-2401, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Cancer Res., 57, 4593-4599, 1997) または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Oncogene, 19, 2138-2146, 2000) などが挙げられる。

【0153】

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗IgE抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗CD23抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗CD11a抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗CRTH2抗体 (J. Immunol., 162, 1278-1286, 1999)、抗CCR8抗体 (WO99/25734)、抗CCR3抗体 (US6207155)、抗インターロイキン6抗体 (Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン6受容体抗体 (Molecular Immunol., 31, 371-381, 1994)、抗インターロイキン5抗体 (Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体 (Cytokine, 3, 562-567, 1991)、抗インターロイキン4受容体抗体 (J. Immunol. Meth., 217, 41-50, 1998)、抗腫瘍壊死因子抗体 (Hybridoma, 13, 183-190, 1994)、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 (Molecular Pharmacol., 58, 237-245, 2000)、抗CCR4抗体 (Nature, 400, 776-780, 1999)、抗ケモカイン抗体 (J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994) または抗ケモカイン受容体抗体 (J. Exp. Med., 186, 1373-1381, 1997) などが挙げられる。

【0154】

循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗GpIIb/IIIa抗体 (J. Immunol., 152, 2968-2976, 1994)、抗血小板由来増殖因子抗体 (Science, 253, 1129-1132, 1991)、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 (J. Biol. Chem., 272, 17400-17404, 1997) または抗血液凝固因子抗体 (Circulation, 101, 1158-1164, 2000) などが挙げられる。

自己免疫疾患、例えば、乾癬、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗自己DNA抗体 (Immunol. Letters, 72, 61-68, 2000)、抗CD11a抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗ICAM3抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗CD80抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗CD2抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗CD3抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗CD4抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗インテグリン $\alpha 4 \beta 7$ 抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗CD40L抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000)、抗IL-2受容体抗体 (Immunology Today, 21, 403-410, 2000) などが挙げられる。

【0155】

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗gp120抗体 (Structure, 8, 385-395, 2000)、抗CD4抗体 (J. Rheumatology, 25, 2065-2076, 1998)、抗CCR5抗体または抗ペロ毒素抗体 (J. Clin. Microbiol., 37, 396-399, 1999) などが挙げられる。

上記抗体は、ATCC、理化学研究所細胞開発銀行、工業技術院生命工業技術研究所等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS社、PharMingen社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社から入手することができる。

【0156】

本発明により得られる抗体組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混

合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

【0157】

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0158】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0159】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

【0160】

また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0161】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ~ 20mg/kg である。

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC活性測定法、ADCC活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

【0162】

CDC活性、ADCC活性、抗腫瘍実験は、文献[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunology Immunotherapy), 36, 373 (1993); キャンサー・リサーチ(Cancer Research), 54, 1511 (1994)]等記載の方法に従って行うことができる。

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

【0163】

α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)を標的としたSmall interfering(si)RNA発現ベクターライブラリーを用いたレクチン耐性株取得に有効なsiRNA標的配列の探索

1. α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)を標的としたsiRNA発現ベクターライブラ

リーFUT8shRNAlib/pPURの作製

(1) CHO細胞由来 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) cDNA配列の取得

W000/061739の記載に従って、チャイニーズハムスター卵巣由来CHO/DG44細胞より調製した一本鎖cDNAより、以下の手順でチャイニーズハムスター由来 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) をコードするcDNAをクローニングした。

【0164】

まず、マウスFUT8のcDNA塩基配列 [GenBank, AB025198] より、5' 側非翻訳領域に特異的なフォワードプライマー (配列番号31に示す) および3' 側非翻訳領域に特異的なリバースプライマー (配列番号32に示す) を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社) を用いて、CHO/DG44細胞由来の一本鎖cDNA 1 μ L を含む25 μ Lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社)、0.2mmol/L dNTPs、4% DMSO、0.5 μ mol/L 上記特異的プライマー (配列番号31および配列番号32)] を調製し、PCRを行った。PCRは、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルを行った後、さらに72℃で10分間反応させた。

【0165】

PCR後、該反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約2Kbを回収した。該DNA断片を、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen社) を用いて、添付の説明書に従ってプラスミドpCR2.1と連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうちcDNAが組み込まれた8クローンから、公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。

【0166】

各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing F S Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社) を用いて添付の説明書に従って、反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM 377を用いて解析した。本法により、全てのプラスミドに挿入されていたcDNAが、チャイニーズハムスターのFUT8のORF全長をコードするcDNAであることを確認した。配列を決定したプラスミドDNAの挿入cDNAうち、PCRに伴う塩基の読み誤りを含まないプラスミドDNAを選択した。以下、本プラスミドをCHfFUT8-pCR2.1と称す。このようにして決定したチャイニーズハムスターのFUT8 cDNAの塩基配列を配列番号1に示した。

(2) FUT8を標的としたsiRNA発現ベクターライブラリーの調製

本項(1)で取得したCHfFUT8-pCR2.1を用いて、W003/046186実施例13に記載の方法に基づき、FUT8を標的としたヒトtRNA-valプロモーター型siRNA発現ベクターライブラリーを作製した。尚、アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAとの間のLoop配列としては制限酵素BamHIの認識配列を用い、pPUR (CLONTECH社) をベクターとして用いた。以下、作製したライブラリーをFUT8shRNAlib/pPUR/DH10Bと称す。

【0167】

siRNA発現ベクターライブラリーFUT8shRNAlib/pPUR/DH10Bを増幅し、プラスミドベクターを調製した。滅菌シャーレ [243mm x 243mm x 18mm (Nalgenunc社)] を用いて100 μ g/mLアンピシリンを含むLB寒天培地を作製し、そこに、シャーレ1枚当たり50 μ LのFUT8shRNAlib/pPUR/DH10Bのグリセロールストックを播種した。37℃にて一晩静置培養した後、プレート上の菌体を滅菌水に懸濁して回収し、公知の方法に従ってプラスミドDNAを回収した。以下、回収したプラスミドをFUT8shRNAlib/pPURと称す。

2. α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) を標的としたsiRNA発現ライブラリーを導入したレクチン耐性株の取得

本実施例第1項で得たFUT8を標的としたsiRNA発現ライブラリープラスミドFUT8shRNAlib/pPURを、参考例に記載の方法で取得したCHO/DG44細胞を宿主細胞とする抗CCR4キメラ化抗体生産株の1つである32-05-12株へ導入し、 α 1,6-フコースを特異的に認識するレクチンであるLCAに耐性を有する株を、以下のようにして取得した。

【0168】

本実施例第1項で得たプラスミドFUT8shRNAlib/pPURを制限酵素FspI (New England Bio

labs社)で消化して線状化し、線状化した10 μ gのプラスミドFUT8shRNAlib/pPURを1.6 \times 10⁶個の32-05-12株へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]で導入した後、基本培地[10% ウシ胎児透析血清 (Invitrogen社)、50 μ g/mL ゲンタマイシン (ナカライテスク社)、および500nmol/L MTX (SIGMA社)を含むIscove's Modified Dulbecco's Medium (以下IMDMと称す; Invitrogen社)]に懸濁し、接着細胞培養用10cmディッシュ (Falcon社) 3枚へ8mLずつ播種した。この時、同一の条件で10回の遺伝子導入を行い、合計30枚の培養用10cmディッシュにおいて培養を行った。5%CO₂ インキュベーター内で37℃、24時間培養後、ピューロマイシン (SIGMA社) を12 μ g/mLの濃度で含む基本培地8mLに培地交換した。5%CO₂ インキュベーター内で37℃、7日間培養した後、ピューロマイシン (SIGMA社) を12 μ g/mLの濃度で、およびLCA (VECTOR社) を0.5mg/mLの濃度で含む基本培地 8mLに培地交換し、さらに6~8日間の培養を行い、レクチン耐性クローンを取得した。

3. α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) を標的としたsiRNA発現プラスミドの標的配列の解析

(1) レクチン耐性株ゲノムDNA上のsiRNA発現カセットの単離

本実施例第2項で得られたレクチン耐性株に対し、以下のようにしてゲノムDNAよりsiRNA発現カセットの単離を行った。

【0169】

レクチン耐性クローンを、公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (Greiner社) へ採取し、ピューロマイシン (SIGMA社) を12 μ g/mLの濃度で含む基本培地を用いて5%CO₂ インキュベーター内で37℃、1週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2枚の接着細胞用平底96穴プレート (Greiner社) へ播種した。このうち1枚のプレートをレプリカプレートとする一方、残りの1枚のプレートをマスタープレートとして凍結保存に供した。レプリカプレートは、ピューロマイシン (SIGMA社) を12 μ g/mLの濃度で含む基本培地を用いて5%CO₂ インキュベーター内で37℃、1週間培養した後、公知の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々30 μ LのTE-RNase緩衝液(pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、200 μ g/mL RNase A] に一晩溶解した後、0.05 μ g/ μ Lの濃度となるように滅菌水で希釈した。

【0170】

また、FUT8を標的としたsiRNA発現プラスミドFUT8shRNAlib/pPURの、siRNA発現カセットのtRNA-valプロモーター領域の上流に結合するフォワードプライマー (配列番号33) およびsiRNA発現カセットのターミネーター配列の下流に結合するリバースプライマー (配列番号34) を各々設計した。

DNAポリメラーゼKOD polymerase (東洋紡績社) を用いて、上記で調製した各クローンのゲノムDNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCRは、各クローンについて、上記のゲノムDNA溶液を5 μ L含む50 μ Lの反応液 [KOD Buffer1 (東洋紡績社)、0.2mmol/L dNTPs、1mmol/L MgCl₂、0.4 μ mol/L 上記プライマー (配列番号33および配列番号34)] を調製し、94℃で1分間の加熱の後、97℃で10秒間、68℃で30秒間からなる反応を1サイクルとした25サイクルの条件で行った。

【0171】

PCR後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、siRNA発現カセットを含む領域の増幅断片約300bpを回収した。

一方、プラスミドpPUR (CLONTECH社) 2.0 μ gを制限酵素PvuII (New England Biolabs社) を加えて37℃で一晩消化反応を行った。消化反応後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約4.3KbのDNA消化断片を回収した。

【0172】

上記で得られたPCR増幅断片 (約300bp) を Ligation High (東洋紡績社) を用いてプラス

ミドpPUR由来のPvuII断片と、連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。

(2) siRNA発現ユニットに含まれる標的配列の解析

本項(1)で得られたプラスミド中のsiRNA発現カセットに含まれるFUT8に対する標的配列の解析を行った。

【0173】

まず、本項(1)で得た各プラスミドDNAに挿入されたsiRNA発現カセットの塩基配列を、BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社)を用いて添付の説明書に従って、反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM 377を用いてを解析した。決定した159クロンの塩基配列のうち、FUT8に対する標的配列について、CHO細胞FUT8 cDNA配列(配列番号1)との相同性を比較し、各標的配列の分布を図1に示した。また、各標的配列の配列番号1に対応する開始点および終止点を表1に示した。

【0174】

【表1】

表1

クローン 番号	標的配列 開始点	標的配列 終止点	標的配列 長さ(bp)
1	1	19	19
2	1	20	20
3	1	22	22
4	2	31	30
5	5	30	26
6	29	53	25
7	35	60	26
8	35	62	28
9	76	103	28
10	78	105	28
11	83	112	30
12	87	112	26
13	95	120	26
14	96	120	25
15	97	121	25
16	100	133	25
17	121	146	26
18	144	170	27
19	148	174	27
20	150	174	25
21	175	200	26
22	216	242	27
23	221	260	40
24	230	256	27
25	245	267	23
26	268	296	29
27	275	300	26
28	276	306	31
29	278	308	31
30	279	306	28
31	283	309	27
32	301	326	26
33	302	328	27
34	330	361	32
35	334	359	26
36	372	398	27
37	401	428	28
38	534	563	30
39	534	566	33
40	536	563	28
41	539	565	27
42	543	567	25
43	543	570	28
44	545	569	25
45	561	589	29
46	567	589	23
47	603	629	27
48	608	640	33
49	642	660	19
50	642	663	22
51	642	670	29
52	650	679	30
53	663	689	27
54	682	708	27
55	710	736	27
56	711	741	31

クローン 番号	標的配列 開始点	標的配列 終止点	標的配列 長さ(bp)
61	824	850	27
62	824	852	29
63	824	854	31
64	824	857	34
65	827	858	32
66	828	853	26
67	834	858	25
68	834	858	25
69	834	860	27
70	880	906	27
71	886	913	28
72	898	926	29
73	900	922	23
74	905	930	26
75	907	934	28
76	912	937	26
77	917	946	30
78	932	952	21
79	950	968	19
80	986	1013	28
81	990	1019	30
82	1015	1042	28
83	1022	1049	28
84	1046	1071	26
85	1062	1089	28
86	1073	1102	30
87	1095	1124	30
88	1112	1137	26
89	1122	1145	24
90	1138	1169	32
91	1149	1174	26
92	1149	1182	34
93	1150	1181	32
94	1157	1181	25
95	1166	1191	26
96	1180	1207	28
97	1211	1237	27
98	1254	1278	26
99	1340	1365	26
100	1340	1370	31
101	1416	1445	30
102	1422	1448	27
103	1425	1453	29
104	1428	1460	33
105	1441	1468	28
106	1451	1480	30
107	1463	1481	29
108	1464	1489	26
109	1465	1490	26
110	1498	1517	20
111	1498	1517	20
112	1499	1528	28
113	1501	1534	34
114	1502	1529	28
115	1504	1529	26
116	1504	1530	27

クローン 番号	標的配列 開始点	標的配列 終止点	標的配列 長さ(bp)
121	1555	1578	24
122	1584	1612	29
123	1588	1615	28
124	1591	1615	25
125	1591	1619	29
126	1602	1626	25
127	1602	1629	28
128	1610	1637	28
129	1613	1637	25
130	1619	1645	27
131	1622	1647	26
132	1680	1707	28
133	1687	1713	27
134	1729	1746	18
135	1730	1746	17
136	1730	1746	17
137	1744	1758	15
138	1744	1768	25
139	1744	1773	30
140	1765	1796	32
141	1786	1811	26
142	1821	1839	19
143	1821	1842	22
144	1821	1844	24
145	1863	1890	28
146	1927	1951	25
147	1940	1965	26
148	1948	1984	37
149	1949	1976	28
150	1951	1979	29
151	1957	1982	26
152	1957	1982	26
153	1963	1987	25
154	1963	1989	27
155	1963	1990	28
156	1964	1987	24
157	1965	1990	26
158	1974	2000	27
159	1978	2008	31

【0175】

159クローンの標的配列のうち、代表的であった標的配列を図中のAからJで示した。AからJの領域に対応するFUT8の塩基配列は、それぞれ領域Aは配列番号9、領域Bは配列番号10、領域Cは配列番号11、領域Dは配列番号18、領域Eは配列番号12、領域Fは配列番号17、領域Gは配列番号13、領域Hは配列番号14、領域Iは配列番号15、領域Jは配列番号16で示した。尚、本項(1)で得た各プラスミドのうち、配列番号9に含まれる配列を標的配列とするsiRNA発現プラスミドを以下FUT8shRNA/lib1/pPUR、配列番号10に含まれる配列を標的配列とするsiRNA発現プラスミドを以下FUT8shRNA/lib2/pPUR、配列番号11に含まれる配列を標的配列とするsiRNA発現プラスミドを以下FUT8shRNA/lib3/pPUR、配列番号12に含まれる配列を標的配列とするsiRNA発現プラスミドを以下FUT8shRNA/lib4/pPUR、配列番号13に含まれる配列を標的配列とするsiRNA発現プラスミドを以下FUT8shRNA/lib5/pPUR、配列番号14に含まれる配列を標的配列とするsiRNA発現プラスミドを以下FUT8shRNA/lib6/pPUR、配列番号15に含まれる配列を標的配列とするsiRNA発現プラスミドを以下FUT8shRNA/lib7/pPUR、配列番号16に含まれる配列を標的配列とするsiRNA発現プラスミドを以下FUT8shRNA/lib8/pPUR、配列番号17に含まれる配列を標的配列とするsiRNA発現プラスミドを以下FUT8shRNA/lib9/pPUR、配列番号18に含まれる配列を標的配列とするsiRNA発現プラスミドを以下FUT8shRNA/lib10/pPURとそれぞれ称す。

(3) siRNA発現ユニットに含まれる標的配列のマウス、ラットおよびヒトのホモログ配列の検索

本項(2)で得られた配列番号9~18で示される標的配列に相当する配列をマウス、ラットおよびヒトのFUT8の配列中から、以下のようにして検索した。

【0176】

配列番号2はマウスのFUT8を、配列番号3はラットのFUT8を、配列番号4はヒトのFUT8の配列をそれぞれ示す。該配列中より、本項(2)で得られた配列番号9~18で示される標的配列に相当する配列を検索した。このとき、完全に一致する配列を除外した。

以下に、選択した配列の配列番号をそれぞれ示す。配列番号10に対応するマウスFUT8の配列は配列番号19、配列番号10に対応するヒトFUT8の配列は配列番号20、配列番号11に対応するヒトFUT8の配列は配列番号21、配列番号12に対応するヒト、マウスおよびラットFUT8の配列は配列番号22、配列番号13に対応するマウスFUT8の配列は配列番号23、配列番号13に対応するヒトFUT8の配列は配列番号24、配列番号13に対応するラットFUT8の配列は配列番号25、配列番号14に対応するマウスおよびラットFUT8の配列は配列番号26、配列番号14に対応するヒトFUT8の配列は配列番号27、配列番号15に対応するマウスFUT8の配列は配列番号28、配列番号15に対応するヒトFUT8の配列は配列番号29、配列番号17に対応するラットFUT8の配列は配列番号30にそれぞれ示した。

【実施例2】

【0177】

α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)を標的としたsiRNA発現プラスミド導入によるレクチン耐性CHO/DG44細胞の作製と該細胞のFUT8 mRNA量の定量

1. α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)を標的としたsiRNA発現プラスミドを導入したレクチン耐性株の取得

実施例1第3項(1)において得たsiRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib1/pPUR、FUT8shRNA/lib2/pPUR、FUT8shRNA/lib3/pPUR、FUT8shRNA/lib4/pPUR、FUT8shRNA/lib5/pPUR、FUT8shRNA/lib6/pPUR、FUT8shRNA/lib7/pPUR、FUT8shRNA/lib8/pPUR、FUT8shRNA/lib9/pPURおよびFUT8shRNA/lib10/pPURを、各々32-05-12株へ導入し、LCA耐性株を取得した。各種siRNA発現プラスミドの32-05-12株への遺伝子導入は、以下のように行った。

【0178】

上記の各siRNA発現プラスミド10 μ gを、制限酵素FspI(New England Biolabs社)で消化して線状化し、線状化した10 μ gの各siRNA発現プラスミドを1.6 $\times 10^6$ 個の32-05-12株へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]によ

り導入した後、基本培地[10% ウシ胎児透析血清 (Invitrogen社)、50 μ g/mL ゲンタマイシン (ナカライテスク社)、および500nmol/L MTX (SIGMA社) を含むIMDM (Invitrogen社)] に懸濁し、接着細胞培養用10cmディッシュ (Falcon社) 4枚へ8mLずつ播種した。5%CO₂ インキュベーター内で37℃、24時間培養後、ピューロマイシン (SIGMA社) を12 μ g/mL の濃度で含む基本培地8mLに培地交換した。5%CO₂ インキュベーター内で37℃、7日間培養した後、ピューロマイシン (SIGMA社) を12 μ g/mL の濃度で、およびLCA (VECTOR社) を0.5mg/mL の濃度で含む基本培地 8mLに培地交換し、さらに6~8日間の培養を行い、レクチン耐性クローンを取得した。さらに6~8日間の培養を行い、レクチン耐性株を取得した。以下、siRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib1/pPURを導入したレクチン耐性株を12-lib1、siRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib2/pPURを導入したレクチン耐性株を12-lib2、siRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib3/pPURを導入したレクチン耐性株を12-lib3、siRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib4/pPURを導入したレクチン耐性株を12-lib4、siRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib5/pPURを導入したレクチン耐性株を12-lib5、siRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib6/pPURを導入したレクチン耐性株を12-lib6、siRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib7/pPURを導入したレクチン耐性株を12-lib7、siRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib8/pPURを導入したレクチン耐性株を12-lib8、siRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib9/pPURを導入したレクチン耐性株を12-lib9、siRNA発現プラスミドFUT8shRNA/lib10/pPURを導入したレクチン耐性株を12-lib10とそれぞれ称す。

2. α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) を標的としたsiRNA発現プラスミドを導入したレクチン耐性株におけるFUT8のmRNA量の定量

本実施例第1項で得たレクチン耐性株12-lib1、12-lib2、12-lib3、12-lib4、12-lib5、12-lib6、12-lib7、12-lib8、12-lib9、12-lib10、および上記レクチン耐性株の親株である32-05-12株に対し、FUT8のmRNA量の定量を行った。

【0179】

上記レクチン耐性株をそれぞれ、ピューロマイシン (SIGMA社) を12 μ g/mL の濃度で含む基本培地[10% ウシ胎児透析血清 (Invitrogen社)、50 μ g/mL ゲンタマイシン (ナカライテスク社)、および500nmol/L MTX (SIGMA社) を含むIscove's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen社)] に3 \times 10⁵個/mLの細胞密度で懸濁し、接着細胞用T25フラスコ (Greiner社) に播種して5%CO₂ インキュベーター内で37℃、3日間培養後、トリプシン処理を施した。トリプシン処理により得られた各細胞懸濁液を3000rpm、4℃の条件で5分間の遠心分離を行って上清を除去し、ダルベッコPBS緩衝液 (Invitrogen社) に懸濁した。再度3000rpm、4℃の条件で5分間の遠心分離を2回行った後、-80℃で凍結した。また、遺伝子を導入していない親株である32-05-12株についても、ピューロマイシンを含まない基本培地を用いて同様に培養を行い、細胞を回収した。

【0180】

上記で得られた各細胞を室温で融解後、RNAeasy (QIAGEN社) を使用し、添付の説明書に従い、全RNAを抽出した。得られた全RNAを45 μ Lの滅菌水に溶解し、DNase処理を行い、各試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN社) により各全RNAを再精製し、40 μ Lの滅菌水に溶解した。

得られた各全RNA3 μ gに対し、SUPERScriptTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen社) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ(dT) プライマーを用いて逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。

【0181】

競合的PCRによるFUT8遺伝子の転写量および β -アクチン遺伝子の転写量の定量を、以下のように行った。

上記の一本鎖cDNAを含む該反応液を滅菌水にて50倍に希釈した水溶液を、各々使用するまで-80℃で保管した。W000/61739実施例8に記載の方法に従い、各細胞株由来全cDNAを鋳型とした競合的PCRを実施し、各細胞株由来全RNA中のFUT8のmRNA量および β -アクチンのmRNA量を測定した。異なる細胞間で β -アクチンmRNA量は均一であると考え、 β -アクチンのmRNA量に対するFUT8のmRNA量の相対値を算出した結果、FUT8を標的としたsiRNA発現

プラスミド導入により得られたレクチン耐性株では親株と比較してFUT8のmRNA量が低下していた。

参考例

CHO/DG44細胞を用いた生産細胞の作製

1. 抗CCR4キメラ抗体の安定生産細胞の作製

CHO/DG44細胞に対し、WO01/64754記載の抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160を導入し、抗CCR4キメラ抗体の安定生産細胞を以下のように作製した。

【0182】

抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160の4 μ gを 1.6×10^6 細胞のCHO/DG44細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10mLのIMDM-dFBS(10)-HT(1) [ウシ胎児透析血清 (Invitrogen社) を10%、HT supplement (Invitrogen社) を1倍濃度で含むIMDM培地 (Invitrogen社)] に懸濁し、96ウェル培養用プレート (旭テクノグラス社) に100 μ L/ウェルずつ分注した。5%CO₂37℃、24時間培養した後、IMDM-dFBS(10) (透析FBSを10%で含むIMDM培地) に培地交換し、1~2週間培養した。HT supplement非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現したウェルより培養上清を回収し、上清中の抗CCR4キメラ抗体の発現量を本参考例第2項記載のELISA法により測定した。

【0183】

培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、MTXを50nmol/L含むIMDM-dFBS(10) 培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mLになるように懸濁し、24ウェルプレート (旭テクノグラス社) に0.5mLずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、1~2週間培養して、50nmol/L MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を500nmol/Lに上昇させ、最終的にMTXを500nmol/Lの濃度で含むIMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗CCR4キメラ抗体を生産する形質転換株32-05-12株を得た。

2. 抗体CCR4部分ペプチドに対する結合活性 (ELISA法)

抗CCR4キメラ抗体が反応するヒトCCR4細胞外領域ペプチドとして、配列番号31で示されるアミノ酸配列の化合物1を使用した。化合物1をELISA法の抗原として用いるため、以下の方法でBSA (Bovine Serum Albumin) (ナカライテスク社) とのコンジュゲートを作製した。

【0184】

10 mgのBSAを含むPBS溶液900 μ Lに、100 μ Lの25mg/mL SMCC [4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシリクアシッドN-ヒドロキシサクシンイミドエステル] (SIGMA社) -DMSO溶液を攪拌しながら滴下し、30分間ゆるやかに攪拌した。25mLのPBSで平衡化したNAP-10カラムに1mLの反応液をアプライし、1.5mLのPBSで溶出させ、溶出液をBSA-SMCC溶液とした (A₂₈₀測定からBSA濃度を算出)。次に、0.5 mgの化合物1に250 μ LのPBSを加え、次いで250 μ Lのジメチルスルフォキシド (DMF) を加えて完全に溶解させた後、前述のBSA-SMCC溶液 (BSA換算1.25mg) を攪拌しながら添加し、添加後3時間攪拌した。反応液をPBSに対して4℃、一晚透析し、最終濃度0.05%となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22 μ mフィルターでろ過滅菌した。以下、該溶液をBSA-化合物1溶液と称す。

【0185】

96穴のEIA用プレート (Greiner社) に、上記のBSA-化合物1溶液を0.05 μ g/mL、50 μ L/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS (以下、Tween-PBSと表記する) で洗浄後、形質転換株の培養上清を50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで6000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(γ) 抗体溶液 (American Qualex社製) を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させ

た。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウム の 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を $1\mu\text{L}/\text{mL}$ で添加した溶液] を $50\mu\text{L}/\text{ウェル}$ で加えて発色させ、415nm の吸光度 (以下、OD415 と表記する) をプレートリーダー Benchmark (BIO-RAD 社製) を用いて測定した。本参考例第 1 項で得られた抗CCR4キメラ抗体は、CCR4 に対する結合活性を示した。

【図面の簡単な説明】

【0186】

【図1】 FUT8 を標的とした siRNA 発現ベクターライブラリーを用いた有効 siRNA 標的配列の探索によって得た 159 クローンの標的配列の分布を示した図である。図中の A から J で示される部分は標的配列として選択した部分である。

【配列表】
SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Process for the antibody composition using RNA which inhibits a function of α 1,6-fucosyltransferase

<130>

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2008

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<220>

<400> 1

aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tccaattctt 60
tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120
tggcgttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tatagggtgt 180
catttggttc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240
gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300
cgaataaccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
ctgggaaagg atcatgaaat ctttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gaggggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcattttgga atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgttttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900

gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960
gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020
gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgacccctgc agtgtgggtg 1080
gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
agtataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440
cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500
tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680
atcattggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740
ggaaaaacag gcctgtaccc ttcctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800
cctacatatc ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980
gaagggtgc tgtgccctca agcccatg 2008

<210> 2

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<400> 2

atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60

ttgttatttt atataggtgg tcatttgggt cgagataatg accaccctga tcaactccagc 120

agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300
aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
aggcttatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcattgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactgggtg gatgggagac tgtgttttaga 780
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840
gtaaatgaca aaaacattca agtggctcag ctccccattg tagacagcct ccatcctcgg 900
cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960
ggtgaccctg cagtgtgggtg ggtgtcccag tttgtcaaact acttgattcg tccacaacct 1020
tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260
tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctattttct ggtcagctgg actacacaat 1320
cggtacacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380
gactttctag tgtgtacttt ttcattcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
accctgcac ctgatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500
ggccaaaatg ccacaaatca gattgctgtt tatcctcaca aacctcgaa tgaagaggaa 1560
attccaatgg aacctggaga tatcattgggt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620

aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680
aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 3

<211> 979

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<400> 3

actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactggg ggatgggaga ctgtgtttag 60
acctgtaagt gagacatgca cagacagatc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120
agtgaatgac aaaaatattc aagtgggtgga gctccccatt gtagacagcc ttcacctcgc 180
gcctccttac ttaccactgg ctgttccaga agaccttgca gatcgactcg taagagtcca 240
tggatgatcct gcagtgtggg ggggtgtccca gttcgtcaaa tatttgattc gtccacaacc 300
ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtcac 360
tggagtccat gtcagacgca cagacaaagt gggaacagag gcagccttcc atcccatcga 420
agagtacatg gtacatgttg aagaacattt tcagcttctc gcacgcagaa tgcaagtgga 480
taaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccctgctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540
gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600
tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctctcaggc 660
tgacttccta gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtcgg gttgcttatg aaatcatgca 720
aaccctgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccactcttta gatgacatct actatcttgg 780
aggccaaaat gccacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctcgaa ctgatgagga 840
aattccaatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattggg atggttattc 900
taaaggtgtc aacagaaaac ttggaaaaac aggcttatat ccctcctaca aagtccgaga 960
gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 4

<211> 1728

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<400> 4

atgcggccat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctggggggacc 60
ttgctgtttt atataggtgg tcacttggtg cgagataatg accatcctga tcactctagc 120
cgagaactgt ccaagattct ggcaaagctt gaacgcttaa aacagcagaa tgaagacttg 180
aggcgaatgg ccgaatctct ccggatacca gaaggcccta ttgatcaggg gccagctata 240
ggaagagtac gcgtttttaga agagcagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300
aagaaacaga ccagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcctgaggag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gtttttccta cagagtgaat tgaagaaatt aaagaactta 420
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaatttcttt tggatttagg acatcatgaa 480
aggtctataa tgacggatct atactacctc agtcagacag atggagcagg tgattggcgg 540
gaaaaagagg ccaaagatct gacagaactg gttcagcgga gaataacata tcttcagaat 600
cccaaggact gcagcaaagc caaaaagctg gtgtgtaata tcaacaaagg ctgtggctat 660
ggctgtcagc tccatcatgt ggtctactgc ttcattgattg catatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactggtg gatgggagac tgtatttagg 780
cctgtaagtg agacatgcac agacagatct ggcatctcca ctggacactg gtcagggtgaa 840
gtgaaggaca aaaatgttca agtggtcgag cttccattg tagacagtct tcatccccgt 900
cctccatatt tacccttggc tgtaccagaa gacctcgag atcgacttgt acgagtgcac 960
ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtctcag tttgtcaaact acttgatccg cccacagcct 1020
tggctagaaa aagaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag ctgccttcca tcccattgaa 1140
gagtacatgg tgcatttga agaacatttt cagcttcttg cacgcagaat gcaagtggac 1200
aaaaaaagag tgtatttggc cacagatgac ctttctttat taaaggaggc aaaaacaaag 1260
taccccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttcct ggtcagctgg actgcacaat 1320
cgatacacag aaaattcact tcgtggagtg atcctggata tacattttct ctctcaggca 1380
gatttcctag tgtgtacttt ttcacccag gtctgtcgag ttgcttatga aattatgcaa 1440

acactacatc ctgatgcctc tgcaaacttc cattcttttag atgacatcta ctattttggg 1500
 ggccagaatg cccacaatca aattgccatt tatgctcacc aaccccgaac tgcagatgaa 1560
 attcccatgg aacctggaga tatcattgggt gtggctggaa atcattggga tggctattct 1620
 aaaggtgtca acaggaaatt gggaaggacg ggcctatatc cctcctacaa agttcgagag 1680
 aagatagaaa cgggtcaagta cccacatat cctgaggctg agaaataa 1728

<210> 5

<211> 575

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<220>

<400> 5

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30
 Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45
 Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60
 Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80
 Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95
 Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110
 Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125
 Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140
 Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160
 Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175
 Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190
 Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205
 Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220
 His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255
 Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu

260 265 270
 Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val
 275 280 285
 Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300
 Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320
 Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335
 Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys
 340 345 350
 Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365
 Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380
 His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
 405 410 415
 Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430
 Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445
 Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460
 Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480
 Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495
 Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510
 His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540
 Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560
 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 6

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<400> 6

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe

1

5

10

15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp

20 25 30
 Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45
 Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60
 Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80
 Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95
 Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110
 Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125
 Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140
 Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160
 Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175
 Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190
 Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205
 Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220
 His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255
 Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270
 Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
 275 280 285
 Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300
 Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320
 Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335
 Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350
 Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365
 Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380
 His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
 405 410 415
 Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile

420 425 430
 Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445
 Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460
 Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480
 Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495
 Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510
 His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
 530 535 540
 Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560
 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 7

<211> 575

<212> PRT

<214> Rattus norvegicus

<220>

<400> 7

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30
 Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45
 Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60
 Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80
 Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95
 Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110
 Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125
 Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140
 Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160
 Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175

Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190
 Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205
 Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220
 His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255
 Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270
 Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
 275 280 285
 Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300
 Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Val Arg Val His
 305 310 315 320
 Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335
 Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350
 Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365
 Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380
 His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ala Leu Leu Lys Glu
 405 410 415
 Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430
 Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445
 Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460
 Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480
 Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495
 Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510
 His Lys Pro Arg Thr Asp Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540
 Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560
 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 8

<211> 575

<212> PRT

<215> Homo Sapience

<220>

<400> 8

```

Met Arg Pro Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
  1           5           10           15
Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
      20           25           30
Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
      35           40           45
Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
      50           55           60
Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Pro Ala Ile
      65           70           75           80
Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
      85           90           95
Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Thr Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
      100          105          110
Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
      115          120          125
Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Asn Leu Glu Gly Asn Glu
      130          135          140
Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Phe Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
      145          150          155          160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
      165          170          175
Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
      180          185          190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Lys
      195          200          205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
      210          215          220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
      225          230          235          240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
      245          250          255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Ile
      260          265          270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val
      275          280          285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
      290          295          300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Val Arg Val His
      305          310          315          320
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
      325          330          335

```

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350
 Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365
 Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380
 His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
 405 410 415
 Ala Lys Thr Lys Tyr Pro Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430
 Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445
 Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460
 Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480
 Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495
 Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Ile Tyr Ala
 500 505 510
 His Gln Pro Arg Thr Ala Asp Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540
 Arg Lys Leu Gly Arg Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560
 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 9
 <211> 40
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
 <400> 9
 gaagggaguu gaaacucuga aaaugcgggc auggacuggu

40

<210> 10
 <211> 31
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
 <400> 10
 gaggagaug gcugagucuc uccgaauacc a

31

<210> 11
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 11
ccaaagacau gcagaugaaa uucuuuugga uuu

33

<210> 12
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 12
ucuuggauc ucagaauugg cgcuauugcua cugga

35

<210> 13
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 13
auacacagaa aaucacauuc ggggcgugau cc

32

<210> 14
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 14
ucaucccagg ucuguagggu ugcuuaugaa auca

34

<210> 15
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 15
caucuacuau uuuggaggcc aaaaugccca caacca

36

<210> 16
<211> 31
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 16
ugcacuggug gaacgccucu uugugaaggg c 31

<210> 17
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 17
caagaagcuu ggcuucaaac auccaguau ugga 34

<210> 18
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 18
uauggcaccc agcgaacacu caucuuggaa ucuca 35

<210> 19
<211> 31
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 19
gaggcgaaug gcugagucuc uccgaauacc a 31

<210> 20
<211> 31
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 20
gaggcgaaug gccgaucuc uccggauacc a 31

<210> 21
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 21
ccaaagacau gcagaugaau uucuuuugga uuu 33

<210> 22
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 22
ucuuggauc ucagaauugg cgcuauugcua cuggu 35

<210> 23
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 23
guacacagaa aaucacuuuc ggggugugau cc 32

<210> 24
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 24
auacacagaa aaucacuuuc guggagugau cc 32

<210> 25
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 25
guacacagaa aaucacuuuc ggggcgugau cc 32

<210> 26
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 26
ucauuccagg ucugucgggu ugcuaugaa auca 34

<210> 27
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 27
ucauuccagg ucugucgagu ugcuaugaa auua 34

<210> 28
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 28
caucuacuau uuuggaggcc aaaaugccca caauca 36

<210> 29
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 29
caucuacuau uuugggggcc agaaugccca caauca 36

<210> 30
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA
<400> 30
caagaagcuu ggcuucaaac auccaguc auuga 34

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 31
gtctgaagca ttatgtgttg aagc 24

<210> 32
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 32
gtgagtacat tcattgtact gtg 23

<210> 33
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 33
ttcccagtca cgacgtt 17

<210> 34
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 34
caggaaacag ctatgac 17

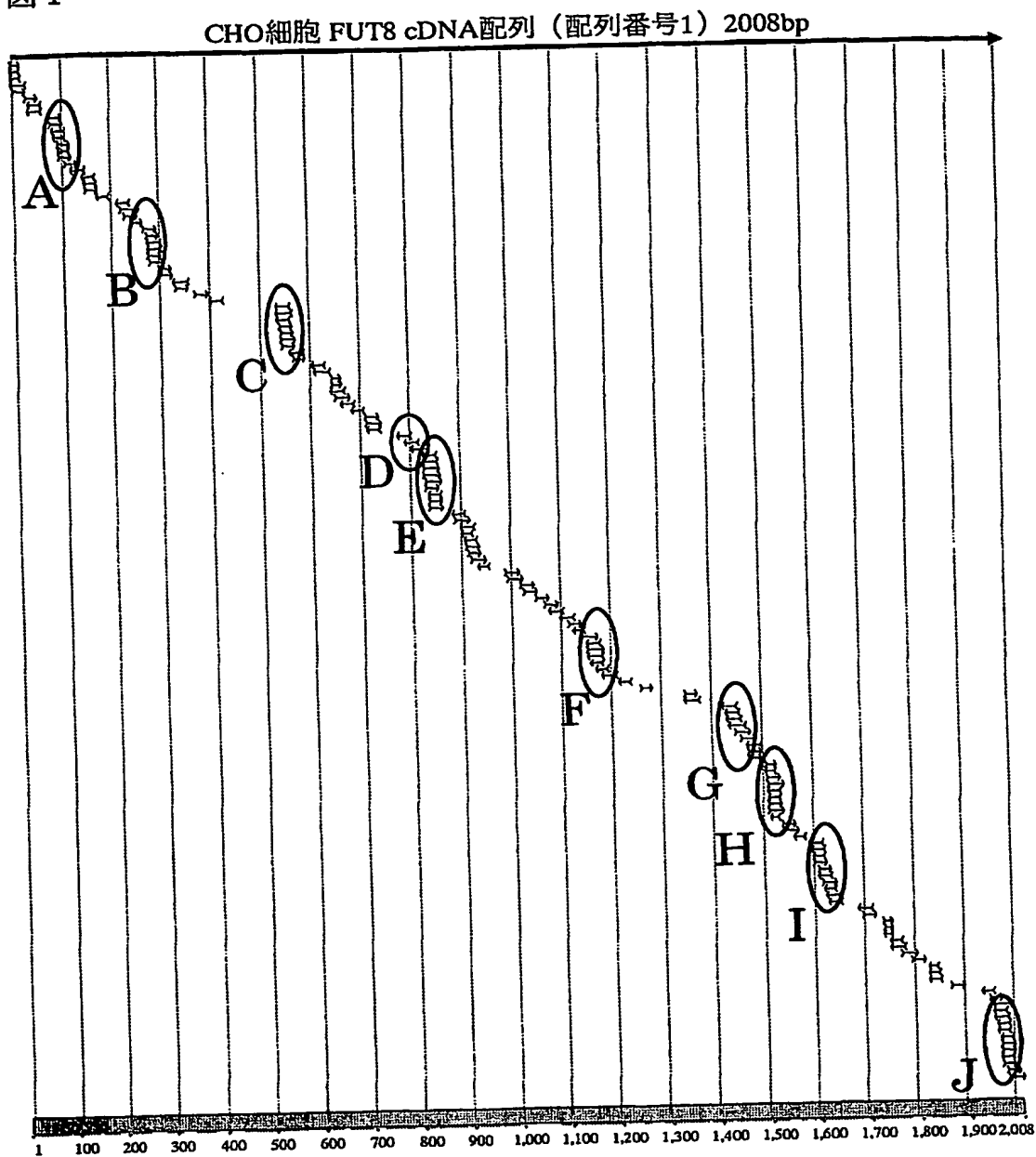
<210> 35
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<400> 35
Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
1 5 10 15



Pro Cys

【書類名】図面
【図1】

図1



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 抗体のエフェクター活性を増強させる方法およびエフェクター活性が増強された抗体組成物が求められている。

【解決手段】 細胞を用いて抗体組成物を製造する方法において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の機能を抑制するRNAを導入した細胞を用いることを特徴とする、抗体組成物を製造する方法、該製造方法で用いられる該RNA、該RNAに対応するDNAおよび該RNAまたはDNAを導入したまたは発現させた細胞、該細胞の作製方法および該酵素を抑制する方法を提供する。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 3 - 3 5 0 1 6 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 2 9]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号

氏 名

協和醗酵工業株式会社